

“Fehérjék konformációs flexibilitása mint a biomolekuláris felismerés és a jeltovábbítás alapvető eleme” (OTKA NK 77978)

Zárójelentés (2009. ápr. 1-től 2013. márc. 31-ig)

A biológiai rendszerek önszerveződésének és az életfolyamatok szabályozásának alapja a molekuláris szintű felismerés, ami szerkezeti és töltés komplementaritáson alapuló dinamikus folyamat. Az elmúlt négy év során fehérjék – elsősorban enzimek – és fehérje komplexek szintjén foglalkoztunk a felismerés (jelgenerálás), jelátadás és az élettani hatás összefüggéseivel. A térszerkezet alapján, a konformációs dinamika figyelembevételével kíséreltük meg az intramolekuláris és molekulák közötti jelátvitel megértését atomi felbontással. Eredményeinket 51 közleményben publikáltuk, jeles nemzetközi folyóiratokban, továbbá a gazdaságilag hasznosítható eredményeinket szabadalmaztattuk. A közlemények összesített impakt faktora 195,121. A kutatócsoport viszonylag nagy létszáma lehetővé tette, hogy a szükséges rekombináns DNS munkát, a fehérjék expresszióját és tisztítását, a szerkezet vizsgálatot és a funkcionális méréseket legnagyobbbrészt magunk végezzük. A csoportban párhuzamosan, egymással kölcsönhatásban, laboratóriumi kísérletező munka és *in silico* bioinformatikai tevékenység folyt.

Kísérleti objektum tekintetében munkánk fókuszában molekuláris immunológiai kérdéskör, a komplementrendszer, azon belül is, a nemrég felfedezett lektin út fehérje komplexei álltak. Ez a rendszer megjeleníti a jelfelismerés, a jeltovábbítás, jelerősítés és a végrehajtás egymástól jól elkülöníthető lépéseit és sok leágazással kapcsolja össze molekuláris szintű védekezést egyéb csatolt folyamatokkal (pl. gyulladás, vazoaktivitás). Ennek révén az elmúlt periódusban számos, immunológiai és élettani szempontból fontos új felismerést tettünk. Gyógyszerfejlesztési szempontból jelentősnek ígérkező eredményeinket két szabadalom védi. Ezzel kapcsolatos hasznosítási szerződéseink alakulóban vannak. Alaputatási és gyakorlati eredményeinket az alábbiakban részletezzük:

A komplementrendszer a természetes immunitás egy ősi, effektor komponense. A kb. 40 fehérjemolekulából álló rendszer képes felismerni, megjelölni és megsemmisíteni a fertőző mikroorganizmusokat és a veszélyesen megváltozott saját struktúrákat (pl. rákos vagy apoptotikus sejtek). A komplementrendszer ezt a sokrétű funkciót önszerveződő fehérjemolekulák összetett hálózata révén látja el. A komplementrendszer ezért ideális objektum arra, hogy tanulmányozzuk a fehérjék önszerveződését, a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, az allosztérikus jelgenerálás és jelerősítés mechanizmusát. A komplementrendszer gerincét olyan szerin proteáz enzimek képezik, amelyek egymást szigorúan meghatározott sorrendben, kaszkádszerűen aktiválják. Az enzimakaszkád aktiválódása során a kezdeti jel nagymértékben felerősödik és olyan effektor mechanizmusok indulnak be (pl. opszonizáció, sejtlyzisz, gyulladásokeltetés), amelyek a veszélyes struktúrák semlegesítéséhez eltávolításához vezetnek. A komplement kaszkád három egymástól többé-kevésbé független úton, a klasszikus, a lektin és az alternatív úton keresztül aktiválódhat. Kutatásaink során elsősorban a klasszikus és a lektin út indító lépéseivel foglalkoztunk. Mindkét aktiválódási útra jellemző, hogy a veszélyes struktúrákat ún. mintázatfelismerő molekulák detektálják, amelyekhez szerin proteáz enzimek kapcsolódnak. Ezek a proteázok zimogén formában vannak jelen mindaddig, amíg a mintázatfelismerő molekula nem kötődik az aktivátor struktúrához. A klasszikus út indító komplexében (C1) a C1q a mintázatfelismerő molekula, amelyhez két C1r és két C1s szerin proteáz molekulából álló tetramer (C1s-C1r-C1r-C1s) kapcsolódik. A lektin út esetében többféle mintázatfelismerő molekula létezik (MBL, H-, L-, M-fikolin), amelyekhez többféle szerin proteáz (MASP-1/-2/-3) is kapcsolódhat ma még nem ismert sztöchiometria szerint. Az OTKA pályázattal finanszírozott

kutatás során legfőbb eredményeinket a szerin proteázok aktiválódásának mechanizmusával és az aktiválódás fiziológiai következményeinek felderítésével kapcsolatban értük el.

A C1 komplex valamennyi ismert modellje feltételezi, hogy az aktiválódás során a C1r₂C1s₂ tetramer nagyfokú flexibilitással rendelkezik a komplexen belül. Eddig azonban nem volt ismert ennek a flexibilitásnak a forrása. Felfedeztük, hogy a C1r molekula CUB2 doménje különleges tulajdonságokkal rendelkezik, ami nagyfokú flexibilitást kölcsönözhet az egész molekulának (Major et al., *J. Biol. Chem.* 285:11863, 2010). A CUB2 doménnek csak Ca²⁺ jelenlétében van rendezett térszerkezete, a fémiont nem kötő formának rendezetlen, flexibilis struktúrája van. Fiziológiás körülmények között a CUB2 domének csak részlegesen vannak telítve kalciummal, ami biztosíthatja az autoaktiválódási folyamathoz szükséges flexibilitást. Feltételezzük, hogy a CUB2 domének Ca²⁺ kapcsolóként működve szabályozzák a C1r autoaktiválódását a C1 komplexen belül.

A lektin út proteázai közül egyedül a MASP-2 képes C4 komponenst hasítani, ezért nélkülözhetetlen a C3-konvertáz enzimkomplex (C4bC2a) kialakításához. Korábbi génszabályozási és enzimkinetikai kísérleteinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a szerin proteáz doménhez kapcsolódó CCP (komplement kontrol protein) modulok döntő módon hozzájárulnak a MASP-2 szubsztrátspecifititásának a kialakításához, feltételezhetően külső kötőhely (exosite) kialakítása révén. A közelmúltban ezt az elméletünket sikerült szerkezeti bizonyítékokkal is alátámasztanunk. Egy dán kutatócsoporttal együttműködve, akik a C4 fehérje szerkezetének megoldásán dolgoztak, sikerült meghatároznunk a MASP-2-C4 enzim-szubsztrát komplex kristályszerkezetét (Kidmose et al. *PNAS* 109:15425, 2012).

Várakozásainknak megfelelően a MASP-2 nem csak szerin proteáz doménjén keresztül kapcsolódik a C4 molekulához, hanem a CCP modulok kötődnek a C4 fehérje C-terminális C345C doménjéhez egy kb. 500Å² területű kötőhelyen keresztül. Egy másik, nem várt külső kötőhelyet is detektáltunk a C4 szulfotirozin régiója és a MASP-2 szerin proteáz doménje között. Tudomásunk szerint ez az első olyan kristályszerkezet, ami egyértelműen bizonyítja a nemkatalitikus domének szerepét egy multidomén szerin proteáz szubsztrátspecifititásának kialakításában. A CCP doméneken található külső kötőhely, mivel nagy valószínűséggel lassítja a termék (C4b) disszociációját a proteázról, fontos szerepet játszik a C3-konvertáz kialakulásának mechanizmusában.

A MASP-1 fiziológiás szerepe az egyik legvitatottabb kérdés a komplementrendszer aktiválódásával foglalkozó kutatók között. Az eddig uralkodó álláspont szerint a MASP-2 a lektin út kulcsenzime, mivel a MASP-2 képes autoaktiválódni valamint C4 és C2 hasítás révén C3-konvertáz komplexet generálni. A MASP-2 tehát, mint ezt *in vitro* kísérletek bizonyítják, egy mintázatfelismerő molekulához kapcsolódva önmagában képes beindítani a komplement kaskádját. A sokkal nagyobb koncentrációban jelenlévő MASP-1 C4-et nem, csak C2-t képes hasítani, ezért ennek az enzimnek csupán kiegészítő szerepet tulajdonítottak az aktiváció mechanizmusában. Az egyes proteázok pontos szerepének a tisztázására egy új stratégiát alkalmaztunk. Az ELTE Biokémiai Tanszékével együttműködve fág-bemutató technikával specifikus inhibitorokat fejlesztettünk a MASP-1 és MASP-2 proteázok ellen (Kocsis et al. *J. Immunol.* 185:4169, 2010). A napraforgó tripszin inhibitorból kiindulva olyan kanonikus inhibitorokat szelektáltunk, amelyek csak a MASP-okat gátolják. Az inhibitorok szelektíven gátolták a lektin utat, meglepetésünkre azonban a MASP-1-et is gátló inhibitor rendkívül hatékony gátlószernek bizonyult. Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy szemben az eddigi elmélettel, a MASP-1-nek fontos szerepe van a lektin út beindításában, nagy valószínűséggel a zimogén MASP-2 gyors hasításán keresztül. Mindezek alapján a MASP-1 egy új targetnek tekinthető a patológikus komplementaktiválódás gátlásában. Ezeket az eredményeket másik vázon szelektált inhibitorok segítségével is megerősítettük, sőt megmutattuk, hogy a C3-konvertáz komplexekben lévő C2a többsége (60%-a) is a MASP-1

hasítás terméke (Héja et al. *PNAS* 109:10498, 2012). Ezt a megközelítést alkalmazva szeretnénk a jövőben a MASP-3 funkcióját is felderíteni.

Sikerült meghatároznunk a MASP-1 katalitikus régiójának térszerkezetét 2.5Å felbontásban (Dobó et al. *J. Immunol.* 183:1207, 2009). A MASP-1 felszíni topológiája inkább hasonlít a széles szubsztrátspecifitással rendelkező tripszinéhez, mint a szűk specificitású komplement proteázokéhoz. A MASP-1 szubsztrátkötő árka széles és viszonylag nyitott. A MASP-1 potenciális proteolitikus aktivitását ugyanakkor csökkenti a hosszú B-hurok (60-as hurok) és az a belső sóhíd, amit az S1 aszparaginsav (Asp⁶⁴⁰) alakít ki egy belső arginin oldallánccal (Arg⁶⁷⁷). A MASP-1 térszerkezete teljesen összhangban van a MASP-1 enzimátikus tulajdonságaival, amelyek arra utalnak, hogy szemben a többi komplement proteázzal, a MASP-1 szubsztrátspecifitása jóval lazább és valószínűsíthető, hogy a komplementrendszeren kívül is vannak szubsztrátjai.

Felfedeztük a komplementrendszer egy új funkcióját, a proteáz általi közvetlen sejttaktiválást. A véralvadási kaskáddal kapcsolatban már korábban ismert volt, hogy egyes proteázok, elsősorban a trombin és a X faktor, képesek aktiválni az endotél sejteket azáltal, hogy hasítják a felszínükön lévő proteáz-aktivált receptorokat (PAR). Logikusnak tűnt, hogy az immunválaszban résztvevő komplementrendszer is rendelkezik hasonló funkcióval. Elsősorban a MASP-1 tűnt alkalmas jelöltnek, mivel rendelkezik trombin-szerű sajátosságokkal: képes fibrinogént és XIII faktort hasítani. A MASP-1 jó hatékonysággal hasította a PAR4 receptor N-terminális szekvenciáját reprezentáló peptidszubsztrátot és endotél sejtek felszínén a PAR4 receptort (Megyeri et al. *J. Immunol.* 183:3409, 2009). A MASP-1 kezelés aktiválta az endotél sejteket: kalcium jelet váltott ki, NF-κB transzlokációt idézett elő és aktiválta a p38 MAP-kinázt. A PAR4 általi endotél sejttaktiváció elősegítheti a leukociták toborzását, letapadását és gördülését. Együttműködőinkkel (SOTE) tovább vizsgáljuk a MASP-1 által az endotél sejteken kiváltott proinflammatorikus folyamatokat, valamint tanulmányozzuk a MASP-1 hatását leukocitákra.

Kimutattuk, hogy a MASP-1 más úton is képes proinflammatorikus folyamatokat kiváltani. Proteomikai módszerrel azonosítottuk a MASP-1 egy újabb szubsztrátját, a nagymolekulasúlyú kininogént. A MASP-1 képes a kininogénből felszabadítani a vazoaktív hatású bradykinin peptidet (Dobó et al. *PLoS One* 6:e20036, 2011). E mechanizmus révén a lektin út képes hozzájárulni az érfal permeabilitásának lokális megváltozásához, ezáltal hatékonyabb immunválasz kialakulását téve lehetővé. A reakció hatékonysága alacsony, azonban lokálisan hozzájárulhat a komplementaktiválás által gerjesztett gyulladásos folyamatokhoz. A MASP-1 bradykinin generáló hatásának esetleges orvosi vonatkozásait, pl. a C1-inhibitor hiányos betegek (örökletes angioödéma) vérében megemelkedett bradykinin szint, együttműködőinkkel a jövőben vizsgálni fogjuk.

A komplement rendszer mellett kutatásaink tárgya volt a bakteriális flagellumok önszerveződésének mechanizmusa valamint a flagelláris exportrendszer jelfelismerési mechanizmusa, ezzel kapcsolatban a publikációk mellett szabadalmazott biotechnológiai eljárás is született.

A flagelláris exportrendszer felhasználásán alapuló olyan fehérjeexpressziós eljárást dolgoztunk ki, amelynek segítségével a baktériumokban nagy mennyiségben termeltetett rekombináns fehérjék működőképes formában kijuttathatók a sejtekből, s azok feltárása nélkül a sejt kultúra folyadékából könnyen összegyűjthetők. Az eljárás különösen előnyösnek ígérkezik a nehezen renaturálható fehérjék előállítására, s széleskörű alkalmazásra számíthat a biotechnológiában és gyógyszeripari hatóanyag termelésben. Megmutattuk, hogy a flagellin fehérje exportszignálját tartalmazó oligopeptidet a biokonverziós technológiákban széles körben alkalmazott *Candida antarctica* lipáz B enzim amino-terminálisához kapcsolva a

termelődött fehérje működőképes formában kijuttatható a flagelláris exportrendszer segítségével a baktériumkultúra felülúszójába.

A FliI ATPáz a flagellum-specifikus exportrendszer egyik kulcsfontosságú komponense, amely meghatározó szerepet játszik az exportálandó flagelláris alegységek kitekerésében és a kijuttatást végző membránfehérjékhez történő továbbításban. Korábban problémaként lépett fel a FliI fehérje aggregációja és érzékeny N-terminális régiójának elemésztődése. A glutation-S-transzferáz (GST) fehérjét a FliI N-terminális régiójához fuzionáltattuk, ami megvédi a FliI sérülékeny N-terminális részét és elősegíti annak feltekeredését, s mindezek mellett lehetővé teszi a fúziós fehérje affinitás kromatográfiás tisztítását. A FliI és a GST közé illesztett TEV proteáz specifikus hasítóhely révén a GST tag a fúziós fehérje izolálása után proteolitikus emésztéssel egyszerűen eltávolítható. A kidolgozott eljárás segítségével a FliI fehérje jelentős mennyiségben tisztítható, ami megnyitja az utat a flagelláris exportrendszer működésében betöltött szerepének vizsgálata előtt. Bár a szakirodalmi adatok szerint a flagelláris exportszubsztrátok a FliI fehérjéhez kötődve fokozzák annak enzimatisz aktivitását, megmutattuk, hogy a flagellin önmagában semmiféle hatást sem gyakorol a FliI működésére. Eredményeink arra utalnak, hogy a FliI az exportrendszer egyéb vízóldékony komponenseivel (FliJ, FliH, FliS) együtt képez egy olyan szupramolekuláris komplexumot, ami képes az exportszubsztrátok megkötésére és azonosítására.

Kutatásaink egyik kiemelt célkitűzése annak vizsgálata, hogy miként használható fel a szupramolekuláris biológiai rendszerek önszerveződő képessége a bio-nanotechnológiában alkalmazható nanoszerkezetek előállítására. A polimerizációra képes flagellin fehérje a bakteriális flagellumok fő építőeleme. Egy olyan új eljárást dolgoztunk ki, amelynek segítségével a flagellin filamentum építésben nélkülözhető D3 doménjének helyére építünk be idegen fehérjét oly módon, hogy mindkét fúziós partner funkcionális tulajdonságai megmaradjanak. Így polimerizációra képes enzimeket, kötőfehérjét vagy fluoreszcens jeladó alegységeket hozhatunk létre. Sikeresen elkészítettünk a egy olyan fúziós fehérjét, amelyben a xilanáz A (XynA) enzimet ültettük be a flagellin fehérje centrális D3 doménjének helyére. Vizsgálataink megmutatták, hogy a XynA fehérje a flagellinbe illetve is ki tudja alakítani natív térszerkezetét, s a FliC-XynA alegységek képesnek bizonyultak filamentáris nanoszerkezetek kialakítására is.

Bár a flagelláris filamentumok szobahőmérsékleten hosszú időn keresztül stabilisak, a filamentumok végén bekövetkező lassú depolimerizáció veszélyeztetheti szerkezeti integritásukat. Olyan kettős cisztein mutáns flagellin alegységeket állítottunk elő, amelyek a filamentáris szerkezetben a szomszédos alegységek között diszulfidhidak spontán kialakítására képesek és jelentősen javították a belőlük képzett filamentumok hőindukálta depolimerizációval szembeni stabilitását. Ezek az eredményeink megermeztik az alapját annak, hogy a jövőben jelentősen megnövelt stabilitású filamentáris nanoszerkezeteket építhessünk, kitégítva ezzel a gyakorlati alkalmazhatóság lehetőségét.

Az egyes enzimek szintjén az allosztérikus jeltovábbítás intramolekuláris mechanizmusát írtuk le atomi felbontással.

A fehérjekonformáció flexibilitásán alapuló allosztérikus mechanizmusok felderítését a munka első fázisában egyedi enzimeken, így a monomer szerkezetű, két doménból felépülő 3-foszfogllicerátkináz (PGK) és a dimer szerkezetű 3-izopropilmalát-dehidrogenáz (IPMDH) esetén vizsgáltuk.

Gyorskinetikai módszerek alkalmazásával igazoltuk a humán PGK katalízise során átadódó foszfo-csoportot kötő oldallánc (K215) szerepét a katalízisben és a nukleotid-szubsztrát által irányított allosztérikus konformáció-változásokban. Megállapítottuk, hogy míg a vad-típusú enzim esetén a katalizált reakció sebesség-meghatározó lépése a termékek képződését követő

konformációváltozás (a domének kinyílása), addig a K215A mutáns esetén maga a kémiai lépés válik sebesség-meghatározóvá (Varga et al, *Biochemistry* 48: 6998, 2009).

Meghatároztuk a vad-típusú humán PGK transition state analóggal (TSA) alkotott zárt doménkonformációjú komplexének valamint aktív centrum mutánsainak (K215A és K219A) kristályszerkezetét 1.6 ill. 1.8 Å felbontásban (Cliff et al, *J. Am. Chem. Soc.* 132:6507, 2010). Az NMR vizsgálatokkal kiegészített kristályszerkezetek egyrészt igazolták a működő aktív centrumban érvényesülő töltés-kompenzáció általános érvényű mechanizmusát, másrészt pedig közvetlen bizonyítékot szolgáltatottak a doménzáródás korábbi munkáinkban feltételezett atomi szintű mechanizmusára.

A humán PGK szubsztrátokkal történő izotermális kalorimetriás titrálási (ITC) adataink termodinamikai analiziséből megállapítottuk, hogy a molekuláris csukló-régióban bekövetkező konformációs átrendeződés hajtóereje a szubsztrátok kötődésekor felszabaduló energia, ami kompenzálja a záródó domének energetikailag kedvezőtlen kölcsönhatási energiáját. A termodinamikai adatokból kiszámítottuk, hogy a doménzáródás szabadentalpia-változásának alacsony értéke (+4 kJ/mól), biztosítja a domén-mozgások könnyített végbemenetelét a katalízis során (Varga et al, *FEBS Lett.* 583: 3660, 2009). További SAXS analizis alapján bebizonyítottuk, hogy az enzimmolekula katalitikus ciklusa nagy részében nyitott, inaktív konformációs állapotban van, a katalízis pedig a rövid életű zárt konformációban megy végbe. A nyitott konformációjú állapot stabilitását bizonyos hidrofób felszíni régiók eltemetettsége biztosítja. Ez a termodinamikai alapja annak, hogy a katalitikus ciklus lezajlása után a zárt szerkezet könnyen kinyílik és lehetővé teszi a termékek távozását az aktív centrumból (Zerrad et al, *J. Biol. Chem.* 286:14040, 2011).

Vizsgáltuk továbbá a PGK működéséhez alapvető fémion, a Mg^{2+} szerepét a katalízisben. A potenciálisan fémion-kötő aszpartát oldalláncok (D218 és D374) alanin-mutánsai enzimatis és komputeres szimulációs analizise alapján megállapítottuk, hogy a kötött nukleotid-foszfátok mobilitása az enzim aktív centrumában a domén-záródás és a katalízis lényegi velejárója. Ezt a mobilitást a vizsgált aszpartát oldalláncok és az azokkal komplexben lévő Mg^{2+} szabályozza. (Varga et al, *Biochemistry* 51:10197, 2012).

A doménzáródás alloszterikus mechanizmusának alapkutatási szinten történő megismerése lehetővé tette számunkra, hogy a humán PGK nukleotid-szubsztrátokkal szemben mutatott alacsony specificitását és a HIV-elleni terápiában hatásos L-nukleozid-analógok hatékony foszforilálását megértsük (Varga et al, *Mol. Biosyst.* 7:1863, 2011). - Ugyanakkor a nukleotid ribóz-gyűrű OH-csoportjai szubsztrát-orientáló hatása és az azt kísérő alloszterikus szerkezet-változások nélkülözhetetlenek a PGK hatékony működéséhez. Így a ribóz-gyűrűt nélkülöző, szintén HIV-gyógyszerként alkalmazott tenofovir enzimatis foszforilálását a PGK kimutatható sebességgel nem katalizálja, ugyanis a tenofovir nem stabilizálja az enzim aktív, zárt konformációját. A nukleotid-kináz kölcsönhatás e jellemzői fontos támpontot jelenthetnek új gyógyszerek tervezésénél (Varga et al, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48:307, 2013).

A 3-izopropilmalát-dehidrogenáz (IPMDH) működését kísérő alloszterikus konformációváltozások (doménmozgások ill. az alegységek közötti információ-átadás) mechanizmusa szerkezeti alapjainak felderítésére előállítottuk kristályos állapotban és röntgendiffrakciós analizissel jellemeztük a *Thermus thermophilus* IPMDH apoenzimet, továbbá az IPMDH*Mn, IPMDH*Mn*IPM, az IPMDH*Mn*NAD és IPMDH*Mn*NADH komplexeket. Egykristály mikrospektrofotometria segítségével megállapítottuk azt is, hogy az IPMDH*Mn*IPM kristálya az enzimet funkcionálisan kompetens konformációban tartalmazza. A szerkezetek összehasonlító grafikai analizise megmutatta a katalízishez nélkülözhetetlen relatív doménmozgások mikéntjét. A mozgást az IPM szubsztrát közvetítésével két csukló-régió biztosítja: az α - β F között, ill. az α H- β E között elhelyezkedő csuklók. A konzervált aminosav-oldalláncok kölcsönhatásainak analizise fényt derített a molekuláris csuklók atomi szintű működésére is. A domének közötti mélyedésben kialakuló

hidrofób alegységkontaktusok is közreműködnek a záródásban. Az IPMDH szerkezete és működése a domének és alegységek közötti nagyfokú kooperativitást példázza (Gráczer et al, *Mol. Biosyst.* 7:1646, 2011).

Az IPMDH működését kísérő alloszterikus változások további vizsgálatára előállítottuk a *Thermus thermophilus* (Tt) IPMDH*Mn*IPM*NADH komplex kristályát és meghatároztuk annak 2.0 Å felbontású szerkezetét. Ez a nem működő inaktív komplex jól modellezi a működő aktív IPMDH*Mn*IPM*NAD komplexet. Fontosabb jellemzői a domének teljesebb záródása és a kötött szubsztrát kötőszögeinek, feltehetően a reaktív állapotot jobban megközelítő torzulása, a korábbról ismert IPMDH*Mn*IPM komplexben megfigyeltekhez képest. A grafikus analízis további betekintést tett lehetővé a domén-mozgások szerkezeti részleteibe, továbbá megmutatta a két alegység közötti kontaktusok kiterjedését a két szubsztrát (IPM és NADH) együttes kötődése következményeként. Kiemelendő még az aktiváló K⁺-kötőhely szerkezeti azonosítása és hipotézis felállítása az aktiválás mechanizmusáról (Palló et al., 2013, kézirat előkészületben).

Az oldott enzimmal végzett kísérletekben kimutattuk a fémion (Mn²⁺ vagy Mg²⁺) alapvető szerepét a szubsztrát (IPM) által indukált doménzáródási folyamatban. SAXS kísérletekben csak elhanyagolható mértékű (0-5%) doménzáródást mutattunk ki fémion távollétében. Fluoreszcencia-rezonancia energiatranszfer (FRET) és denaturációs kísérleteink is azt mutatták, hogy a natív Tt ill. Ec IPMDH konformációs stabilitását kizárólag a fémion*IPM komplex segíti elő; a fémionnak és az IPM-nek külön-külön nincs kimutatható hatása. A fémion szerepére lehetséges szerkezeti magyarázatot adtunk (Gráczer et al, *FEBS Lett.* 585:3297, 2011).

Gyorskinetikai módszerekkel (stopped flow, SF és quenched flow, QF) megállapítottuk, az IPMDH katalitikus ciklusa során a reakció sebességmeghatározó lépése a redox-lépés (azaz a NAD → NADH átalakulás) után következik be és feltehetően azonos a domének kinyílásának folyamatával. A doménzáródás folyamatát képviselő FRET kinetikájának analízise megmutatta, hogy ez a konformációs lépés irányítja a redox lépést, azaz a NADH képződését a katalízis során (Gráczer et al, *FEBS J.* 280:1764, 2013).

A Tt (ill. Ec) IPMDH működését biztosító doménmozgások és alegységkölsönhatások mélyebb megértése hozzásegíthet ahhoz, hogy a homológ *Mycobacterium tuberculosis* IPMDH ellen specifikus gátlószereket tervezzünk, melyek új gyógyszerjelöltek lehetnek a tuberkulózis elleni küzdelemben.

Az elméleti, bioinformatikai munka részben a kísérleti munka tervezését és értelmezését szolgálta, e mellett arra törekedtünk, hogy kísérleti eredményeinket általános fiziológiai pl. evolúciós kontextusba helyezzük.

A fehérjék konformációs dinamikájának nem csak a rövid (pikoszekundumtól milliszekundumig terjedő) időskálákon van szerepe. A fehérjék lehetséges dinamikai mozgásai meghatározhatják a szerkezet evolúciójának lehetséges irányait az evolúció több milliárd éves időskáláján is. Erre találtunk bizonyítékot a fehérjék egy új csoportjának, az ún. *szegmenscserélt fehérjéknek* (segment-swapped proteins) a felfedezésével. A szegmenscsere jelensége az ún. 3D doméncsere jelenségéhez (3D domain swapping), melyben két egyforma monomerből oly módon képződik dimer, hogy a monomerek felnyílnak és egy-egy, egymásnak megfeleltethető régiójukat „kicserélik” egymás között. A szegmenscserélt fehérjékben ugyanez egyetlen alegységen belül játszódik le. Az alegység két, egymáshoz szerkezetileg hasonló, de szekvenciában nem azonos doménből épül fel, e két domén között történik a megfelelő régiók cseréje, ezáltal olyan kétdoménos fehérjét létrehozva, melynek egyik doménjét az N- és C-terminális, másik doménjét pedig a lánc középső része képezi. 18 fehérjecsaládban 32 ilyen fehérjét azonosítottunk. A szegmenscserélt fehérjék evolúciós kialakulásának lehetséges mechanizmusait bioinformatikai módszerekkel vizsgáltuk. Két fő

mechanizmust tételeztünk fel: a „doméncsere és fúzió”, valamint a „cirkuláris permutáció” mechanizmusokat, s megállapítottuk, hogy a legtöbb esetben valószínűleg a „doméncsere és fúzió” mechanizmus hozta létre az adott szegmenscserélt fehérjét. Mindkét mechanizmus esetében azonban a kiinduló, ősi domén szerkezeti flexibilitása az, amely lehetővé teszi a domén adott helyen történő felnyílását, ill. a két részdomén asszociációját, s ezáltal a szegmenscserélt fehérje evolúciós kialakulását.

A munka eredményét először 2011-ben ismertettük a Budapesten megrendezett European Biophysics Congress-en ismertettük, majd a *J. Mol. Biol.* folyóiratban publikáltuk (Szilágyi et al., *J Mol Biol* 415:221, 2012).

A konformációs dinamika jelentős járulékot ad a fehérjemolekulák entrópiájához. Ennek mérése azonban nehéz, számítógépes becslése pedig szintén problematikus. Ezért egy új módszert fejlesztettünk ki fehérjemolekulák entrópiájának becslésére molekuladinamikai szimulációk eredményéből. E munkából PhD dolgozat született, a publikáció 2013-ban várható.

A konformációs flexibilitás nagy szerepet játszik az ún. kapcsolt kötődés és felgombolyodás jelenségében. Ennek legérdekesebb esete, amikor két, monomerként rendezetlen polipeptidlánc asszociálódva rendezett szerkezetű homodimert hoz létre. Ezt a jelenséget egyszerűsített fehérjemodellek segítségével tanulmányoztuk, melyek teljes állapotterét egy újfajta, hálózatos modell segítségével írtuk le. A munka egy részeredményét 2012-ben publikáltuk (Györfly et al., *TCBB* 9:1847, 2012).

Az allosztérikus szabályozás egyik legizgalmasabb kérdése az, hogy a fehérjéken belül az allosztérikus jelek vajon milyen útvonalon haladnak, ill. ezek az útvonalak átlépnek-e egyik fehérjéből a másikba, ezáltal hosszútávú kommunikációt biztosítva az interaktom különböző részei között. E kérdésről és a potenciális gyógyszeripari alkalmazásokról összefoglaló és új javaslatokat tevő cikket közöltünk (Szilágyi et al., *Curr Top Med Chem* 13:64, 2013).

Hazai együttműködésben a jelentős rendezetlen régiókat tartalmazó transzpozon fehérjék szerkezetének és evolúciójának jellemzésében vettünk részt (Abrusán et al., *Nucl Acids Res* 41:3190, 2013; Abrusán et al., *J Biol Chem*, in press, 2013).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az OTKA kutatás során jelentős eredményeket értünk el a komplementrendszer kutatása terén. Tisztáztuk a lektin út aktiválódásának mechanizmusát, felderítettük a proteázok szubsztrátspecifitásának szerkezeti hátterét és új proinflammatorikus utakat azonosítottunk. Leírtuk a foszfoglicerát kináz enzim allosztérikus működési mechanizmusát, atomi felbontással. Feltártuk az izopropilmalát dehidrogenáz molekuláris csuklóinak működését és szerepét az alegységek kölcsönhatásaiban. A bakteriális flagelláris exportrendszer jelfelismerési mechanizmusának egyes elemeit feltártuk, eredményeink biotechnológiai hasznosításának lehetőségét megteremtettük. Bizonyítékot találtunk arra, hogy a fehérjék konformációs dinamikája meghatározza a szerkezet evolúciójának lehetséges irányait, több milliárd éves időskálán is.